

1. 本製品を安全にご利用いただく為の注意事項

本製品を安全にお使いいただくために、まず本取扱説明書をよくお読みください。本取扱説明書の内容を十分に理解されるまで、操作はお控えください。また本取扱説明書は、本製品を指定の目的に使用する方法のみ記載しております。本取扱説明書に記載されていない目的・方法でのご使用はお控えください。万が一、本取扱説明書に記載されていない目的、方法でご使用の場合、必要な安全対策及び不測の事態は全て操作なさる方の責任となります。また、同時に使用する装置の取扱説明書も熟読しご理解ください。

2. 使用目的

本製品はウエスタンブロッティング解析において、HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）標識抗体で検出する際に用いるルミノール系発光基質です。

3. 本製品の構成

名称	容量	個数
EzWestLumiOne イージーウェストルミワン	250mL	1本

4. 組成

名称	主成分
EzWestLumiOne イージーウェストルミワン	ルミノール、エンハンサー、安定化剤、過酸化水素、緩衝液

本製品は毒物劇物取締法の毒物又は劇物、労働安全衛生法、PRTR法指定化学物質の除外規定量を超える通知対象物は含まれておりません。詳しくはアトホームページ（<http://www.atto.co.jp/>）より本製品のMSDSをダウンロードしてご確認ください。

5. 保存方法

- EzWestLumiOneは遮光・冷蔵（2-8℃）保存です。未開封の状態であれば使用期限内は安定です。

6. 廃棄方法

- 各試薬の廃棄は、ご所属機関の廃棄方法に準拠してください。
- ボトル材質 本体：ポリエチレン
フタ：ポリプロピレン

7. 本製品以外に必要なもの

- 電気泳動用ゲル
- ブロッティング膜ろ紙
- 電気泳動用試薬（サンプルバッファー、電極液等）
- ウェスタンブロッティング用試薬

（トランスファーバッファー、ブロッキング試薬、抗体希釈液、洗浄液等）

- 目的タンパク質に対する一次抗体およびHRP標識二次抗体
- 電気泳動装置
- セミドライ式ブロッティング装置
- シーソーシェーカー
- ピンセット
- ケミルミ撮影装置

8. 使用上のご注意

- 本製品は遮光・冷蔵保存してください。室温に長時間放置すると劣化する原因となりますのでご注意ください。
- 抗体の希釈率は抗体メーカーの推奨濃度、もしくは一次抗体を1/1,000～1/10,000、二次抗体を1/50,000～1/200,000でご使用ください。

9. 使用方法

1. EzWestLumiOneを冷蔵庫から取り出します。ミニゲルサイズ（85mm×90mm）のブロッティング膜1枚あたりの発光試薬の必要量は5mLです。
※発光試薬の必要量は、50～100μL/cm²です。
2. HRP標識抗体と反応後のブロッティング膜をEzWash等の洗浄バッファーで十分に洗浄します。
※洗浄が不十分な場合、バックグラウンドが高くなることがあります。
3. 清潔なトレイ（メンブレンより大きめ）に必要な量のEzWestLumiOneを入れます。
※トレイの代わりにプラスチックラップを広げて使用することもできます。
4. 洗浄後のブロッティング膜をEzWestLumiOneに数秒間浸漬します。ブロッティング膜全体にEzWestLumiOneが行き渡ることをご確認ください。
※ブロッティング膜がEzWestLumiOneに均等に浸らない場合、泡状のバックグラウンドやムラになる原因となりますのでご注意ください。
5. ブロッティング膜を透明なフィルムあるいはプラスチックラップに空気が入らないように挟みます。
※ブロッティング膜とフィルムの間に空気が入ると、泡状のバックグラウンドやムラになる原因となりますのでご注意ください。
※ラップに包む場合、ラップの皺がブロッティング膜の表面側にできると皺状のバックグラウンドやムラが生じる原因になりますのでご注意ください。
6. EzWestLumiOneと反応後のブロッティング膜をケミルミ撮影装置で撮影します。

※撮影時間はサンプルの濃度と抗体の力価および希釈率により異なります。各実験ごとにご確認ください。

※ケミルミ撮影装置の使用方法は各製造メーカーにお問い合わせください。

10. 参考資料

ブロッキングは同じプロトコールでもちょっとした手技の違いで大きく結果が異なることがあります。最適な結果を得るためには「コツ」も重要です。

アトホームページより「ウエスタンブロッキングのコツ」がダウンロードできますので、ご一読ください。
<http://www.atto.co.jp/>

11. トラブルシューティング

原因	解決策
トラブル①：バンドが見えません	
ブロッキングが正しく行われていません	高分子量のタンパク質をブロッキングする場合、ブロッキング時間の延長および泳動ゲルのアクリルアミド濃度の低下により改善されます。 低分子量のタンパク質をブロッキングする場合、ブロッキング試薬に添加するメタノールの量を1.5~2倍程度に増加すると改善されます。
検出系が正しくありません	EzWestLumiOne はHRPの発光基質です。HRP以外の標識抗体を用いた場合には検出できませんのでご注意ください。
アプライするサンプル量が少ないです	サンプル中のターゲットタンパク質の含有量が検出限界以下の場合、正しく操作が行われても検出できません。アプライするサンプル量の検討を行ってください。
抗体の力価が低い/失活しています	抗体がターゲットタンパク質と反応することをドットブロット法などでご確認ください。抗体の適切な希釈率も合わせてご確認ください。
ブロッキング反応が強すぎます	長時間のブロッキングやブロッキング試薬の濃度が高いとオーバーブロッキングの原因となり、検出感度が低下します。ブロッキング試薬の種類やブロッキング時間の検討を行ってください。
抗体の濃度が低すぎます	抗体の力価が低い場合には希釈しすぎにより検出できない場合があります。抗体の希釈率および希釈液をご確認ください。

トラブル②：バンドが流れています	
サンプル量が過剰です	過剰量のタンパク質が混在すると電気泳動のパターンがゆがんだり、ブロッキングの際にバンドが流れる原因となります。1レーンあたりにアプライするタンパク質量は5 µg以下を目安にしてください。
ゲルと膜の密着が不十分です	ろ紙、ゲル、クリアプロットPプラス膜を重ね合わせた後、上から軽く押さえながら専用ローラーを転がして過剰なブロッキング溶液と気泡を除きます。ゲルとクリアプロットPプラス膜の間にブロッキング溶液が過剰に存在すると、溶液中にタンパク質が拡散しバンドが流れる原因となります。
トラブル③：非特異的なバンドが検出されます	
洗浄が不十分です	洗浄溶液の洗浄の強さは界面活性剤濃度、塩濃度とpHに依存します。非特異的なバンドが多い場合には、界面活性剤濃度と塩濃度をご確認ください。
目的タンパク質の分解あるいは重合体です	サンプル処理液（ EzApply など）に含まれる還元剤（DTTなど）が失活している可能性が考えられます。不完全な還元サンプルは重合体を形成し、非特異的なバンドとして検出される場合があります。またタンパク質サンプル調整時に分解が生じた場合、分解産物が検出される可能性があります。サンプルの再調整をご確認ください。
抗体の非特異的反応です	抗体のエピトープが他のタンパク質に非特異的に反応する場合があります。抗体の希釈率やブロッキング条件の検討を行っても改善されない場合、別の抗体へ変更していただくことを推奨します。
トラブル④：バックグラウンドが高いです	
ブロッキングが不十分です	ブロッキング反応が不十分な場合、バックグラウンドが高くなる原因となります。適切なブロッキング剤の選択、界面活性剤や塩濃度の検討、ブロッキングの反応時間などをご確認ください。
洗浄が不十分です	バックグラウンドを低減するためには洗浄操作前の「リンス」のステップが重要です。洗浄直前の反応で使った反応液を容器から完全に除去してください。同様に洗浄液の交換時には、前のステップの洗浄液が残らないようにご注意ください。洗浄操作を確実に行うようご注意ください。
抗体濃度が高いです	抗体の力価が高い場合、充分洗浄操作を行っても微量な抗体が残存し、バックグラウンドの原因になることがあります。事前にご使用になる抗体の適切な抗体濃度をご確認ください。
トラブル⑤：バックグラウンドに模様があります	
溶液量が少ないです	ブロッキング溶液、抗体溶液、洗浄溶液などの溶液量が不十分な場合、バックグラウンドの上昇や反応ムラになる原因となります。ご使用になる溶液量は充分量をご準備ください。
振とう速度が不適切です	振とう速度が不適切な場合、溶液中に三角波が発生します。三角波の直下は液交換が不十分になり反応ムラの原因となります。三角波が発生しないように振とう速度をご確認ください。



アト株式会社

主要製品

- ヘリスタブン
- クロマトグラフ
- 電気泳動分析機器

- DNA分析装置
- 画像分析システム
- 発光分析装置
- バイオ研究機器
- 医療分析装置

- 本 社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2
- ◆技術サービス
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6
- （東京都許可 医療機器製造業）
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

- TEL (03) 5827-4861 (代表) Fax (03) 5827-6647
- TEL (03) 5827-4873 (代表) Fax (03) 5827-4874
- TEL (03) 5818-7560 (代表) Fax (03) 5818-7563
- TEL (06) 6136-1421 (代表) Fax (06) 6356-3625

■URL <http://www.atto.co.jp/>

■本社 e-mail: info@atto.co.jp